

(3)

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07025716 A**(43) Date of publication of application: **27 . 01 . 95**

(51) Int. Cl

A01N 63/00(21) Application number: **04109503**(22) Date of filing: **28 . 04 . 92**(71) Applicant: **HOKKAI SANKYO KK**(72) Inventor: **SASAKI MASATO
MORITA TETSUO
AOKI ATSUSHI**

(54) CONTROL OF DISEASE INJURY DEVELOPED IN RICE PLANT NURSERY BED BY TREATING RICE PLANT SEED WITH MICROORGANISM

(57) Abstract:

PURPOSE: To suppress or control the development of plural disease injuries occurring in a rice plant nursery bed without using a chemical agrochemical by directly inoculating a specific bacterium having antagonistic action on many pathogenic microbes into a rice plant seed.

CONSTITUTION: A rice plant seed is treated with a bacterium of the genus *Pseudomonas* having antagonistic action on pathogenic microbes of disease injuries developed in a rice plant nursery bed, especially the bacterium of the species *Pseudomonas cepacia*, among

them, new *Pseudomonas cepacia* AGF-158 strain (FERM P-3834) to suppress and control the disease injuries developing in the rice plant nursery bed. For example, bakanae disease, damping-off, blast, bacterial damping-off and bacterial brown stripe of the rice plant are cited as the disease injuries developing in the rice plant nursery bed. The *Pseudomonas cepacia* AGF-158 strain is capable of manifesting strong antagonistic action on plant pathogenic molds and plant pathogenic bacteria. The economic burden on farmers cultivating the rice plant is reduced and many operations following the disinfection of the rice plant seed with a germicide can be omitted by this method for controlling which is effective even against resistant microbes.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-25716

(43)公開日 平成7年(1995)1月27日

(51)Int.Cl.⁶
A 01 N 63/00

識別記号 庁内整理番号
F 9155-4H

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 ○L (全7頁)

(21)出願番号 特願平4-109503

(22)出願日 平成4年(1992)4月28日

(71)出願人 391011076
北海三共株式会社
札幌市中央区大通り西8丁目1番地
(72)発明者 佐々木 正人
北海道札幌市豊平区豊平7条8丁目2番1
号 北海三共株式会社内
(72)発明者 森田 哲郎
北海道札幌市豊平区豊平7条8丁目2番1
号 北海三共株式会社内
(72)発明者 齐木 篤
北海道札幌市豊平区豊平7条8丁目2番1
号 北海三共株式会社内
(74)代理人 弁理士 大野 彰夫

(54)【発明の名称】微生物のイネ種子処理によるイネ苗床で発生する病害の防除

(57)【要約】

【目的】イネ苗床で発生する病害を防除すること。

【構成】イネ苗床で発生する病害に拮抗作用を有する *Pseudomonas* 属細菌をイネ種子に処理する、病害の抑制方法。

【効果】各種病害の発生によるイネ栽培農家の経済的負担を軽減し、かつ殺菌剤によるイネ種子消毒に伴う多くの作業を省略等することが可能であり、耐性菌に対しても有効である。化学農薬のように環境汚染を起こさず、本発明に用いる拮抗微生物は自然界に存在する細菌であり、大量に施用する必要がないことから環境汚染を起こす可能性が小さい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】イネ苗床で発生する病害の病原菌に拮抗作用を有するPseudomonas属細菌をイネ種子に処理することを特徴とするイネ苗床で発生する病害の抑制方法。

【請求項2】細菌がPseudomonas cepacia種細菌である、請求項1に記載の病害抑制方法。

【請求項3】細菌がPseudomonas cepacia AGF-158株である、請求項1に記載の病害抑制方法。

【請求項4】Pseudomonas cepacia AGF-158株。

【発明の詳細な説明】

【0001】[発明の目的]

【0002】

【産業上の利用分野】本発明はイネ苗床で発生する病害を、細菌により防除する方法に関する。更に詳しくは、イネ苗床で発生する病害の病原菌に拮抗作用を有するPseudomonas属細菌、例えばPseudomonas cepacia AGF-158株をイネの種子に接種することにより、イネ苗床で発生する病害、例えばイネ馬鹿苗病、イネ苗立枯病、イネいもち病、イネ苗立枯細菌病、イネ褐条病等を抑制する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】イネ苗床で発生する病害には糸状菌による馬鹿苗病、苗立枯病、いもち病、ごま葉枯病、細菌による苗立枯細菌病、粉枯細菌病（苗腐敗）、褐条病などの病害がある。それらの防除に関しては、馬鹿苗病、いもち病、ごま葉枯病は殺菌剤による種子消毒、苗立枯病は殺菌剤の土壤混和処理、細菌による病害には糸状菌とは別の殺菌剤の種子消毒あるいは土壤混和処理など、それぞれ別の手段により防除されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、イネ苗床で発生する病害の、上記以外の実用的な防除法はない。また最近発生が多くなっているイネ苗立枯細菌病の場合、現在登録農薬がないため現場ではこの病害の対策に苦慮している。

【0005】さらに、同系殺菌剤の連用に伴い耐性（抵抗性）菌が出現し、その殺菌剤の効果がほとんど無くなることが常に危惧される。例えば、馬鹿苗病ではベンズイミダゾール系殺菌剤に対する耐性菌、褐条病ではカス

形態

大きさ

運動性

鞭毛

水溶性色素の生成

螢光性色素の生成

胞子の有無

グラム染色性

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸顆粒の集積

生長素要求性

酸素に対する反応

ガマイシン剤に対する耐性菌、いもち病ではカスガマイシン剤及びIBP剤に対する耐性菌が出現している。現在使用されているトリアゾール系殺菌剤やメタラキシリル剤もまた耐性菌出現の可能性を秘めている。

【0006】殺菌剤を使用する場合、その種類によっては直接皮膚に薬剤が付着すると人によってかぶれを生ずることがある。またイネの種子消毒では濃厚な薬液を使用するが、魚毒性の強い殺菌剤が多く、使用した薬液の処分に注意し水産動物への被害を防止する必要がある。さらに薬剤間によっては同時に処理または近接処理を行なうと薬害を生じる恐れがある組合せもあり、異なる病害を1回の薬剤処理で防除することが困難な場合がある。

【0007】本発明者らは、殺菌剤などの化学農薬を使う際の上記諸問題を解消あるいは緩和するために鋭意研究した結果、多くの病原菌に対し拮抗作用を有する細菌を直接イネ種子に接種することにより、化学農薬を用いずにイネ苗床で発生する複数の病害の発生を抑制及び防除できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】[発明の構成]

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、イネ苗床で発生する病害の病原菌に拮抗作用を有するPseudomonas属細菌、好適にはPseudomonas cepacia種細菌、更に好適にはPseudomonas cepacia AGF-158株をイネの種子に接種し、イネ苗床で発生する病害を抑制、防御する方法である。

【0010】本発明に使用するPseudomonas属細菌及びPseudomonas cepacia種細菌としては、イネ苗床で発生する病害の抑制活性を有するものであれば良く、好適にはPseudomonas cepacia AGF-158株を挙げることができる。

【0011】Pseudomonas cepacia AGF-158株は、北海道札幌市近郊より採取した土壤で栽培したイネの根面より分離したものである。

【0012】このPseudomonas cepacia AGF-158株は、植物病原性糸状菌及び植物病原性細菌に対して強い拮抗活性を示す。以下に、その菌学的性質を示す。

【0013】

桿菌

0.8~1.0×1.8~3.0ミクロン

有り

単極毛、1本以上

陽性（黄~緑）

陰性

無し

陰性

陽性

陰性

好気性

オキシダーゼ活性	陽性
カタラーゼ活性	陽性
レバジン産生	陰性
ゼラチンの液化	陽性
レシチナーゼ (egg yolk)	陽性
デンプンの加水分解	陰性
Tween 80 の加水分解	陽性
カゼインの加水分解	陽性
エスクリンの加水分解	陰性
脱窒反応	陰性
硝酸塩の還元	弱陽性
アルギニン・デヒドロラーゼ活性	陰性
ウレアーゼ	陽性
リトマス・ミルク	リトマスは還元、ペプトン化
硫化水素の產生	陰性
V P テスト	陰性
M R テスト	陰性
O F テスト	O型
グルコン酸の酸化	陰性
アスパラギンの利用	陽性
ジャガイモ・スライスの軟化	陰性
タマネギ・スライスの軟化	陽性
4°Cにおける生育	弱陽性
41°Cにおける生育	弱陽性
生育適温	30~37°C
pH 4.1における生育	陰性
pH 8.8における生育	陰性
最適生育pH	pH 5~7
3% 塩化ナトリウムでの生育	陽性
5% 塩化ナトリウムでの生育	陰性

糖類から酸の生成

陽性のもの；グルコース、フラクトース、ガラクトース、アラビノース、マンニトール、グリセリン、ソルビット、ショ糖、サリシン、ラクトース、マルトース、セロビオース、D-キシロース

陰性のもの；ラフィノース、m-イノシトール、ラムノース

利用能試験

陽性のもの；D-キシロース、D-リボース、D-アラビノース、グルコース、L-アラビノース、D-マンノース、ガラクトース、フラクトース、トレハロース、セロビオース、マンニトール、m-イノシトール、ソルビット、グリセリン、ショ糖、レブリン酸、酢酸、ビルビン酸、コハク酸、乳酸、プロビオン酸、p-ヒドロキシ安息香酸、β-ヒドロキシ酪酸、酪酸、マロン酸、クエン酸、2,3-ブチレングリコール、L-トリプトファン、L-アルギニン、L-バリン、L-リジン、β-アラニン、ベタイン、ブトレッシン、ラクトース、ラフィノース、グリコール酸、m-ヒドロキシ安息香酸、アドニット、ベンジルアミン、アセトアミド、サリシン

弱陽性のもの；L-ラムノース

陰性のもの；マルトース、デンプン、イソプロパノール、エタノール、ゲラニオール、メサコン酸、D(-)-酒石酸、ニコチン酸、フタル酸、バントテン酸、フェノール、プロピレングリコール、エチレングリコール、トリプタミン、グリシン、ナフタレン、シュウ酸、マレイン酸。

【0014】以上の性質から Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1.(第9版)を参考にすると、本菌は *Pseudomonas cepacia* (シュードモナス セバシア) に非常に近縁な種である。しかし利用能試験においてトリプタミンの利用という点で、記載されている *Pseudomonas cepacia* と異なる。よって本菌を *Pseudomonas cepacia* AGF-158株と命名した。この *Pseudomonas cepacia* AGF-158株は、工業技術院微生物工業技術研究所に「微工研条寄第3834号 (BP-3834)」として寄託されている *Pseudomonas cepacia* Polleroni et Holmes AGF-158株と同一菌株である。

【0015】*Pseudomonas cepacia* AGF-158株は、苗床で発生するイネの病原菌や各種作物の病原菌の多くに対

し拮抗活性を示す。寒天培地上で *Pseudomonas cepacia* AGF-158株と各病原菌を対峙させて培養を行うと、イネ馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*)、イネ苗立枯病菌 (*Fusarium solani*, *Rhizopus oryzae*, *Pythium graminicola*, *Pythium spinosum*)、イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*)、イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)、イネ苗立枯細菌病菌 (*Pseudomonas plantarii*)、イネ褐条病菌 (*Pseudomonas avenae*)、イネ紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)などの生育が著しく抑制された。その結果を表1に示す。なお、活性の表示は以下の基準に従つ

(各種病原菌に対する *Pseudomonas cepacia* AGF-158株の拮抗活性)

対象病原菌名	病名	活性
<i>Pyricularia oryzae</i>	イネいもち病	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	イネ紋枯病	++
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	イネごま葉枯病	+++
<i>Gibberella fujikuroi</i>	イネ馬鹿苗病	+++
<i>Gibberella fujikuroi</i> (薬剤耐性菌)	イネ馬鹿苗病	+++
<i>Rhizopus oryzae</i>	イネ苗立枯病	+
<i>Pythium graminicola</i>	イネ苗立枯病	+++
<i>Pythium spinosum</i>	イネ苗立枯病	++
<i>Trichoderma viride</i>	イネ苗立枯病	+
<i>Fusarium solani</i>	イネ苗立枯病	+++
<i>Fusarium nivale</i>	コムギ紅色雪腐病	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lagenariae</i>	ユウガオつる割病	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	タマネギ乾腐病	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>	キュウリつる割病	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	トマト萎凋病	+++
<i>Botrytis cinerea</i>	イチゴ灰色かび病	+++
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	インゲン菌核病	+++
<i>Streptomyces scabies</i>	バレイショそうか病	+++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	テンサイ斑点細菌病	+++
<i>Pseudomonas avenae</i>	イネ褐条病	+++
<i>Pseudomonas plantarii</i>	イネ苗立枯細菌病	++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	根頭がんしゅ病	+++
<i>Corynebacterium michiganense</i>	トマトかいよう病	+++

イネ種子への病害菌拮抗活性を有する菌の処理は、例えば、イネの種子の浸種期間中に浸種水に菌体を接種することにより行なわれる。

【0018】すなわち、イネの種子を催芽させるために行う浸種操作（種子を水に数日間漬ける）の際、浸種水に病害菌拮抗活性を有する *Pseudomonas* 属細菌の菌体を適量接種するという方法である。また、浸種前に本菌体をイネ乾燥種子にまぶして接種しても良い。接種された菌は浸種水中で増殖し、イネ種子に付着し、播種後もイネの種子と根に菌が定着する。

【0019】イネ苗床で発生する病害に拮抗作用を有する細菌を直接使用して、病害を防除する方法としては、

た。

【0016】(基準)

- : 拮抗活性なし
- + : 脆い拮抗活性を示す（阻止帯の幅 3 mm 以下）
- ++ : やや強い拮抗活性を示す（阻止帯の幅 3 ~ 8 mm）
- +++ : 強い拮抗活性を示す（阻止帯の幅 8 mm 以上）

【0017】

【表1】

菌を固体培地で培養し、イネ育苗土壌あるいは育苗用に市販されている人工覆土に混和するという方法も考えられるが、本発明の方法は、この土壌混和処理方法よりも各種病害抑制効果が高く、特に種子伝染（汚染種子）で発生する馬鹿苗病、苗立枯細菌病、褐条病に対して有効に発揮される。

【0020】

【発明の効果】本発明は各種病害の発生によりイネ栽培農家がイネ育苗時に受ける大きな経済的負担を軽減し、なおかつ殺菌剤によるイネ種子消毒に伴う多くの作業を省略、薬剤処理量を半減、あるいは処理薬剤数を減らすことが可能であり、特定の薬剤が効果を消失している耐

性菌に対しても有効である。拮抗微生物の利用は化学農薬のように環境汚染を起こさないことが一つの特徴であるが、本発明に用いる拮抗微生物は遺伝子操作を施した細菌ではなく自然界に存在する細菌であり、空気中に細菌を大量に施用する必要がないことから環境汚染を起こす可能性は小さい。

【0021】

【試験例】以下に実施例及び参考例を挙げ、本発明を具体的に示す。

【0022】なお、以下の試験例において、固体培地、液体培地及び人工培土は下記のものを使用した。

【0023】固体培地—大豆粉4%、グリセリン4%、塩化ナトリウム0.6%溶かした液60mlをバーミキュライト25gに加えたもの。

【0024】液体培地—大豆粉2%、グリセリン2%、塩化ナトリウム0.3%溶かした液(滅菌後pH7に調整)。

【0025】人工培土—育苗用に市販されている人工培土(商品名:くみあい粒状培土H)

【0026】

【試験例1】

(イネ馬鹿苗病の防除試験)馬鹿苗病菌が感染しているイネ汚染種子(品種:松山三井)を用いた。

【0027】種子の浸種条件は20°C、3日間、32°C、24時間とした。

【0028】*Pseudomonas cepacia* AGF-158株(以下、AGF-158株という)の浸種水接種処理

AGF-158株を液体培地で27°C、2日間培養し、遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル(種子500cc浸漬、以下において同じ)当たり 4×10^{11} コロニー生成単位(以下cfuと略す)接種した。

【0029】AGF-158株の土壤混和処理

AGF-158株を固体培地で26°C、7日間培養し、これを人工培土に混和(容量比1:1)したものを作り供した。

【0030】播種後16日間ガラス温室内で育苗した後、馬鹿苗病の発病を調べた結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

処理	馬鹿苗病の発病苗率
AGF-158株の浸種水接種処理	29%
AGF-158株の土壤混和処理(覆土のみ)	40%
無処理	74%

【0032】

【試験例2】

(イネ苗立枯細菌病の防除試験)苗立枯細菌病菌を人工的に接種したイネ汚染種子(品種:ゆきひかり)を用いた。

【0033】種子の浸種条件は20°C、3日間、32°C、24時間とした。

【0034】AGF-158株を液体培地で27°C、3

日間培養し、遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル当たりそれぞれ $2.4 \times 10^8 \sim 2.4 \times 10^{12}$ cfu(5段階)と菌量を変えて接種した。

【0035】播種後21日間ガラス温室内で育苗した後、苗立枯細菌病の発病を調べた結果を表3に示す。

【0036】

【表3】

処理	苗立枯細菌病の発病苗率
AGF-158株の浸種時接種処理	
2.4×10 ¹² cfu/1リットル浸種水	3.2%
2.4×10 ¹¹ cfu/1リットル浸種水	2.4%
2.4×10 ¹⁰ cfu/1リットル浸種水	19.1%
2.4×10 ⁹ cfu/1リットル浸種水	31.6%
2.4×10 ⁸ cfu/1リットル浸種水	34.3%
無処理	99.2%

【0037】

【試験例3】

(イネ苗立枯細菌病の防除試験)苗立枯細菌病菌を人工的に接種したイネ汚染種子(品種:ゆきひかり)を用い

た。

【0038】種子の浸種条件は15°C、4日間、32°C、24時間とした。

【0039】AGF-158株の浸種水接種処理

AGF-158株を液体培地で27°C、3日間培養し、遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル当たり 1.4×10^{10} cfu接種した。

【0040】AGF-158株の乾燥種子接種処理
浸種前に菌体を乾燥種子10g当たり 1.4×10^{10} c

fuまぶして接種した。

【0041】播種後20日間ガラス温室内で育苗した後、苗立枯細菌病の発病を調べた結果を表4に示す。

【0042】

【表4】

処理	苗立枯細菌病の発病苗率
AGF-158株の浸種水接種処理	10.2%
AGF-158株の乾燥種子接種処理	20.9%
無処理	100.0%

【0043】

【試験例4】

(イネ褐条病の防除試験) 褐条病菌を人工的に接種したイネ汚染種子(品種: ゆきひかり)を用いた。

【0044】種子の浸種条件は20°C、3日間、32°C、24時間とした。

【0045】AGF-158株の浸種水接種処理

AGF-158株を液体培地で27°C、2日間培養し、遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル当

たり 2.9×10^{11} cfu接種した。

【0046】AGF-158株の土壤混和処理

AGF-158株を固体培地で26°C、7日間培養し、これを人工培土に混和(容量比1:1)したもの覆土に供した。

【0047】播種後21日間ガラス温室内で育苗した後、褐条病の発病を調べた結果を表5に示す。

【0048】

【表5】

処理	褐条病の発病苗率
AGF-158株の浸種水接種処理	7.0%
AGF-158株の土壤混和処理(覆土のみ)	20.5%
無処理	64.8%

【0049】

【試験例5】

(イネ褐条病の防除試験) 褐条病菌を人工的に接種したイネ汚染種子(品種: ゆきひかり)を用いた。

【0050】種子の浸種条件は20°C、3日間、32°C、24時間とした。

【0051】AGF-158株を液体培地で27°C、3

日間培養し、遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル当たり $2.4 \times 10^8 \sim 2.4 \times 10^{12}$ cfu(5段階)と菌量を変えて接種した。

【0052】播種後21日間ガラス温室内で育苗した後、褐条病の発病を調べた結果を表6に示す。

【0053】

【表6】

処理	褐条病の発病苗率
AGF-158株の浸種時接種処理	
2.4×10^{12} cfu/1リットル浸種水	0.8%
2.4×10^{11} cfu/1リットル浸種水	10.0%
2.4×10^{10} cfu/1リットル浸種水	60.0%
2.4×10^9 cfu/1リットル浸種水	65.9%
2.4×10^8 cfu/1リットル浸種水	80.9%
無処理	81.3%

【0054】

【試験例6】

(イネ苗立枯病の防除試験) 健全なイネ種子(品種: 穗育125号)を用い、床土にはあらかじめ滅菌した黒土

に苗立枯病菌(*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*)を接種した病土を用いた。

【0055】種子の浸種条件は20°C、3日間、32°C、24時間とした。

【0056】AGF-158の浸種水接種処理
AGF-158株を液体培地で27°C、3日間培養し、
遠心して集めた菌体を浸種開始時に浸種水1リットル当たり 3.4×10^{11} cfu接種した。

【0057】AGF-158株の土壤混和処理
AGF-158株を固体培地で26°C、7日間培養し、

これを人工培土に混和（容量比1:1）したもの覆土に供した。

【0058】播種後21日間ガラス温室内で育苗した後、各苗立枯病の発病を調べた結果を表7に示す。

【0059】

【表7】

処理	苗立枯病の発病苗率	
	Fusarium	Rhizoctonia
AGF-158の浸種水接種処理	1.2%	0.0%
AGF-158株の土壤混和処理（覆土のみ）	2.9%	0.0%
無処理	10.3%	21.7%

【0060】

【試験例7】

（イネいもち病の防除試験）菌濃度 2.8×10^9 cfu/mlのAGF-158株菌液5mlにイネ乾燥種子（品種：農林20号）5gを浸して接種し、湿室とした9cmペトリ皿に並べ、25°C、12時間照明下に3日間

保った後、種子上のいもち病菌胞子形成の有無を実体顕微鏡下で調査して、イネいもち（苗いもち）病に対する効果を調べた。その結果を表8に示す。

【0061】

【表8】

処理	胞子形成種子率
AGF-158のイネ種子接種処理	0.0%
無処理	38.6%

【0062】

【試験例8】

（イネ馬鹿苗病の防除試験）馬鹿苗病菌（ペノミル剤耐性菌）が感染しているイネ汚染種子（品種：ゆきひかり）を用いた。

【0063】種子の浸種条件は20°C、4日間、32°C、24時間とした。

【0064】AGF-158株の浸種水接種処理
AGF-158株を液体培地で27°C、2日間培養し、
遠心して集めた菌体を浸種開始時又は浸種4日目に浸種

水1リットル当たり 2.5×10^{11} cfu接種した。

【0065】AGF-158株の乾燥種子接種処理
浸種前に菌体を乾燥種子100g当たり 2.5×10^{11} cfu (2.5×10^{10} cfu/mlの菌液を10ml) まぶして接種した。

【0066】播種後20日間ガラス温室内で育苗した後、馬鹿苗病の発病を調べた結果を表9に示す。

【0067】

【表9】

処理	馬鹿苗病の発病苗率
AGF-158株の浸種水接種処理（浸種開始時）	5.7%
AGF-158株の浸種水接種処理（浸種4日後）	9.8%
AGF-158株の乾燥種子接種処理	7.7%
無処理	100.0%